

⑫ 公開特許公報(A) 平1-95792

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成1年(1989)4月13日

C 12 P 1/04
 A 61 K 35/74
 C 07 G 11/00
 //(C 12 P 1/04
 C 12 R 1:38)

ADY

A-6807-4B
 8213-4C
 A-8318-4H

審査請求 未請求 発明の数 3 (全8頁)

⑮ 発明の名称 新規46NW-04A物質、その製造法およびそれを有効成分とする抗
 ウイルス製剤

⑯ 特 願 昭62-251592

⑰ 出 願 昭62(1987)10月7日

⑱ 発 明 者 亀 井 勇 統 北海道上磯郡上磯町七重浜1-7-19
 ⑱ 発 明 者 絵 面 良 男 北海道函館市榎本町6-20
 ⑱ 発 明 者 木 村 喬 久 北海道函館市榎本町6-24
 ⑱ 発 明 者 新 井 好 史 静岡県焼津市塩津278-2-204
 ⑱ 発 明 者 棟 方 正 信 静岡県藤枝市駿河台2-11-17
 ⑱ 発 明 者 上 村 稔 静岡県焼津市小川514-2
 ⑲ 出 願 人 サツポロビール株式会 東京都中央区銀座7丁目10番1号
 社
 ⑳ 代 理 人 弁理士 久保田 藤郎

明 細 書

1. 発明の名称

新規46NW-04A物質、その製造法および
 それを有効成分とする抗ウイルス製剤

2. 特許請求の範囲

1). 下記の物理化学的性質を有する新規46NW
 -04A物質。

(イ) 分子量: 1126 (S I-マックスベクトル
 による)

(ロ) 元素分析(実測値): 炭素54.68%, 水
 素8.49%, 窒素10.0%

(ハ) 融点: 206~208℃

(ニ) 比旋光度: $[\alpha]_D^{25} = -47.5$ (C=2.0,
 メタノール)

(ホ) 紫外線吸収スペクトル: 第1図のとおり

(ヘ) 赤外線吸収スペクトル: 第2図のとおり

(ト) 水素核磁気共鳴スペクトル: 第3図のとおり

(チ) 炭素核磁気共鳴スペクトル: 第4図のとおり

(リ) シリカゲル薄層クロマトグラフィーのR_F値:

0.32(展開溶媒 クロロホルム:メタノール=3:1)

0.51(展開溶媒 酢酸エチル:メタノール=1:1)

0.0(展開溶媒 酢酸エチル)

0.0(展開溶媒 ベンゼン:アセトン=2:1)

(ヌ) 溶媒に対する溶解性:

メタノール, エタノール, アセトン, ジメ
 チルスルホキシドに易溶; クロロホルム,
 酢酸エチル, ベンゼン, ピリジンに可溶;
 ジエチルエーテルに難溶; n-ヘキサン,
 石油エーテル, 水に不溶

(ハ) 呈色反応:

ブロモクレゾールグリーン, ジニトロフェ
 ニールヒドラジン, ドラゲンドルフ, 8
 -ヒドロキシキノリン-NH₂, アニスアル
 デヒドの各試薬に陽性; 過マンガン酸カリ
 ウム, アンスロン, パートン, 酢酸銅, リ
 ーガル, モーリシュ, ニンヒドリン, ロー
 グミンの各試薬に陰性

(ワ) 安定性: pH3~10で安定

(ヰ) 外観点性状: 白色粉末

2). シュードモナス属に属し、下記の物理化学的性質を有する 46NW-04A 物質を生産する細菌を培地に培養し、培養物から該 46NW-04A 物質を採取することを特徴とする新規 46NW-04A 物質の製造法。

- (i) 分子量: 1126 (S I-マスマスベクトルによる)
- (ii) 元素分析 (実測値): 炭素 54.68%, 水素 8.49%, 窒素 10.0%
- (iii) 融点: 206~208℃
- (iv) 比旋光度: $[\alpha]_D^{25} = -47.5$ (C=2.0, メタノール)
- (v) 紫外線吸収スペクトル: 第 1 図のとおり
- (vi) 赤外線吸収スペクトル: 第 2 図のとおり
- (vii) 水素核磁気共鳴スペクトル: 第 3 図のとおり
- (viii) 炭素核磁気共鳴スペクトル: 第 4 図のとおり
- (ix) シリカゲル薄層クロマトグラフィーの R_f 値:
 - 0.32 (展開溶媒 クロロホルム:メタノール=3:1)
 - 0.51 (展開溶媒 酢酸エチル:メタノール=1:1)
 - 0.0 (展開溶媒 酢酸エチル)

- 0.0 (展開溶媒 ベンゼン:アセトン=2:1)
- (x) 溶媒に対する溶解性:
 - メタノール, エタノール, アセトン, ジメチルスルホキシドに易溶; クロロホルム, 酢酸エチル, ベンゼン, ピリジンに可溶; ジエチルエーテルに難溶; n-ヘキサン, 石油エーテル, 水に不溶

- (xi) 呈色反応:
 - プロモクレゾールグリーン, ジニトロフェニールヒドラジン, ドラゲンドルフ, 8-ヒドロキシキノリン-NH₂, アニスアルデヒドの各試薬に陽性; 過マンガン酸カリウム, アンスロン, パートン, 酢酸銅, リーガル, モーリシュ, ニンヒドリン, ローグミンの各試薬に陰性
- (xii) 安定性: pH 3~10 で安定
- (xiii) 外観点性状: 白色粉末

3). シュードモナス属に属する 46NW-04A 物質生産菌が、シュードモナス sp. 46NW-04 (FERM P-9579) である特許請求の範囲

3

第 2 項記載の方法。

4). 下記の物理化学的性質を有する新規 46NW-04 物質を有効成分とする抗ウイルス製剤。

- (i) 分子量: 1126 (S I-マスマスベクトルによる)
- (ii) 元素分析 (実測値): 炭素 54.68%, 水素 8.49%, 窒素 10.0%
- (iii) 融点: 206~208℃
- (iv) 比旋光度: $[\alpha]_D^{25} = -47.5$ (C=2.0, メタノール)
- (v) 紫外線吸収スペクトル: 第 1 図のとおり
- (vi) 赤外線吸収スペクトル: 第 2 図のとおり
- (vii) 水素核磁気共鳴スペクトル: 第 3 図のとおり
- (viii) 炭素核磁気共鳴スペクトル: 第 4 図のとおり
- (ix) シリカゲル薄層クロマトグラフィーの R_f 値:
 - 0.32 (展開溶媒 クロロホルム:メタノール=3:1)
 - 0.51 (展開溶媒 酢酸エチル:メタノール=1:1)
 - 0.0 (展開溶媒 酢酸エチル)
 - 0.0 (展開溶媒 ベンゼン:アセトン=2:1)

(x) 溶媒に対する溶解性:

メタノール, エタノール, アセトン, ジメチルスルホキシドに易溶; クロロホルム, 酢酸エチル, ベンゼン, ピリジンに可溶; ジエチルエーテルに難溶; n-ヘキサン, 石油エーテル, 水に不溶

- (xi) 呈色反応:
 - プロモクレゾールグリーン, ジニトロフェニールヒドラジン, ドラゲンドルフ, 8-ヒドロキシキノリン-NH₂, アニスアルデヒドの各試薬に陽性; 過マンガン酸カリウム, アンスロン, パートン, 酢酸銅, リーガル, モーリシュ, ニンヒドリン, ローグミンの各試薬に陰性
- (xii) 安定性: pH 3~10 で安定
- (xiii) 外観点性状: 白色粉末

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は新規 46NW-04A 物質, その製造法およびそれを有効成分とする抗ウイルス製剤に関するものである。

〔従来の技術、発明が解決しようとする問題点〕

現在、動物性タンパク資源確保の観点から世界的に魚介類の増養殖が活発に行なわれる様になってきている。それに伴ない疾病被害が大きな問題となっている。特にウィルス病はその伝播が早く、被害も極めて大きい。しかるに、従来はこれらの被害を有効に防止しうる薬剤がなく、その開発が強く望まれていた。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明者らは、魚類生息域から分離した微生物の中から魚類病原ウィルスに対する抗ウィルス活性を有するシュードモナス菌(*Pseudomonas* sp.)を発見し、その培養液から抗ウィルス作用を有する46NW-04A物質を単離・精製したところ、従来の報告にない新規な物質であることが判明した。本発明はこのような知見に基づき完成されたものである。

本発明の新規な46NW-04A物質は下記の物理化学的性質を有している。

(イ)分子量：1126 (S1-マスマスペクトルによる)

(ロ)元素分析(実測値)：炭素54.68%，水

素8.49%，窒素10.0%

(ハ)融点：206～208℃

(ニ)比旋光度： $[\alpha]_D^{25} = -47.5$ (C=2.0, メタノール)

(ヒ)紫外線吸収スペクトル：第1図のとおり

(ヘ)赤外線吸収スペクトル：第2図のとおり

(ト)水素核磁気共鳴スペクトル：第3図のとおり

(チ)炭素核磁気共鳴スペクトル：第4図のとおり

(リ)シリカゲル薄層クロマトグラフィーのRf値：

0.32(展開溶媒 クロロホルム：メタノール=3:1)

0.51(展開溶媒 酢酸エチル：メタノール=1:1)

0.0(展開溶媒 酢酸エチル)

0.0(展開溶媒 ベンゼン：アセトン=2:1)

(ル)溶媒に対する溶解性：

メタノール、エタノール、アセトン、ジメチルスルホキシドに易溶；クロロホルム、酢酸エチル、ベンゼン、ピリジンに可溶；ジエチルエーテルに難溶；n-ヘキサン、石油エーテル、水に不溶

7

(ハ)呈色反応：

プロモクレゾールグリーン、ジエトロフェニールヒドラジン、ドラージェンドルフ、8-ヒドロキシキノリン-NH₂、アニスアルデヒドの各試薬に陽性；過マンガン酸カリウム、アンスロン、パートン、酢酸銅、リニール、モーリッシュ、ニンヒドリン、ローグミンの各試薬に陰性

(ニ)安定性：pH3～10で安定

(ロ)外観性状：白色粉末

上記46NW-04A物質は、シュードモナス属に属する上記46NW-04A物質生産菌を培地に培養し、培養液から該物質を採取することによって製造することができる。

上記46NW-04A物質生産菌の1例として、本発明者らが北海道大学水産学部附属七飯養魚実習施設の用水路の水から分離した細菌シュードモナス sp. 46NW-04株がある。このシュードモナス sp. 46NW-04株の菌学的性質は次の通りである。

8

I. 形態学的性質

グラム陰性の桿菌で、芽胞を形成せず、数本の極鞭毛を有する好気性細菌である。

II. 生理学的性質

(1) 生育温度：5～30℃、至適温度：20℃

(2) 酸素に対する挙動：好気性

(3) ゼラチン液化：陽性

(4) 脱窒素能：陰性

(5) レシチン分解能：陽性

(6) アルギニンヒドラーゼ：陽性

(7) PHBの蓄積：陰性

(8) 蛍光色素産生：陽性

(9) オキシダーゼ：陽性

(10) 糖の発酵性：陰性

(11) シュークロースからのレバン形成：陽性

(12) デンブリン分解能：陰性

(13) 酪酸資化性：陽性

(14) プロピレングリコール資化性：陽性

(15) トレハロース資化性：陰性

(16) モルGC%：59.9%

本菌はバージーのマニュアル・オブ・システムチック・バクテリオロジー(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1, 1984 年版)の記載によりシュードモナス・フローレッセンス(*Pseudomonas fluorescens* biovar)に類似した菌と推定された。ただし、本菌は酪酸、プロピレングリコールを資化し、トレハロースを資化しない点で該公知菌と異なっている。それ故、本発明者らは本菌を新菌株シュードモナス sp. 46NW-04 (*Pseudomonas* sp. 46NW-04) 株と命名した。本菌は工業技術院微生物工業技術研究所に受託されており、その受託番号はFERM P-9579)である。

新規な46NW-04A物質を生産するための微生物は上記46NW-04株に限定されず、その変異株のほか46NW-04株以外のシュードモナス属に属するものであっても、当該物質生産能を有する菌株であれば使用することができる。

46NW-04A物質はシュードモナス属に属する46NW-04A物質生産菌を通常の細菌用

液体培地に培養することによって製造することができる。

本発明により上記46NW-04A物質生産菌を培養するために用いる培地としては、当該菌体を利用しうる炭素源、窒素源、無機塩類等を含有するものであればよい。炭素源としては例えばグルコース、マルトース、ガラクトース、シュークロース等が用いられ、窒素源としては例えば肉エキス、酵母エキス、大豆粉、ペプトン、カザミノ酸、硫酸アンモニウム等が用いられる。その他必要に応じて適宜の無機塩類、消泡剤等を添加することができる。

前記のごとき栄養源を有する液体培地で大量培養するには、深部通気液体培養が有利であり、培養温度は20~30℃、特に25~27℃が最適である。

46NW-04A物質の生産に最も適した培地、例えばカザミノ酸0.5%、酵母エキス0.05%、グルコース0.1%、塩化ナトリウム0.68%、塩化カリウム0.04%、硫酸マグネシウム0.02%、

11

塩化カルシウム0.026%を含むpH7.2のCYG培地を用い、25℃でロータリー振盪培養を行った場合、3日間培養すると培養液の抗ウィルス活性は最大となる。

46NW-04A物質の培養液中からの分離・精製は次のようにして行なうことができる。培養液に酢酸エチルを添加して攪拌し、酢酸エチル層を集めて減圧濃縮後、シリカゲル、シリシクアシド等に吸着させ、クロロホルム：メタノール(9:1)からクロロホルム：メタノール(1:1)で溶出され、抗ウィルス活性を示す分画を集め減圧濃縮後、分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィーまたは分取用高速液体シリカゲルクロマトグラフィーで精製する。次いで、この例では最終的には高速液体C₁₈フェニルゲルクロマトグラフィーで単離した。このようにして得られた46NW-04A物質の物理化学的性質を表-1および表-2に示す。

13

12

表-1

46NW-04A物質の物理化学的性質

形 状:	白色粉末
融 点:	206~208℃
比旋光度:	$[\alpha]_D^{25} -47.5 (C=2, \text{メタノール})$
分子量(マスペクトル):	1126
紫外線吸収スペクトル:	第1図
赤外線吸収スペクトル:	第2図
水素核磁気共鳴スペクトル:	第3図
炭素核磁気共鳴スペクトル:	第4図
溶解性:	易溶 メタノール, エタノール, アセトン, ジメチルスルホキシド
可溶	クロロホルム, 酢酸エチル, ベンゼン, ピリジン
不溶	n-ヘキサン, 石油エーテル, 水
呈色反応:	陽性 ブロモクレゾールグリーン, ジニトロフェニルヒドラジン, ドラゲンドルフ, 8-ヒドロキシキノリン-NH ₂ ,

14

アニスアルデヒド
陰性 過マンガン酸カリウム、
アンスロン、パートン、酢酸銅、
リーガル、モーリシュ、ニンヒ
ドリン、ローダミン

安定性：pH 3～10 で安定

表-2

シリカゲル薄層クロマトグラフィーの R_f 値

展 開 溶 媒	R _f 値
クロロホルム：メタノール (3:2)	0.32
酢酸エチル：メタノール (1:1)	0.51
酢酸エチル	0.0
ベンゼン：アセトン (2:1)	0.0

本物質は第2図に示した赤外線吸収スペクトルより 3500～3200 cm⁻¹：アルコール、アミノ基、1730 cm⁻¹：ケトン伸縮振動、1650 cm⁻¹：カルボニル伸縮振動等を持つ化合物であることがわかる。また、第3図水素核磁気共鳴スペクトル、第4図炭素核磁気共鳴スペクトルよりアミノ基、カルボキシル基のピークが認められ、ベ

ブチド系の物質と推定される。

本発明の 46NW-04A 物質の抗ウイルス活性は、サケ科主要病原ウイルスであるサケ科魚類ヘルペスウイルス (OMV) および伝染性造血器壊死ウイルス (IHNV) に対する in vitro での抗ウイルス活性で示し、その結果を表-3に示した。

表-3

魚類病原ウイルスに対する 46NW-04A の抗ウイルス活性

濃度 (μg/ml)	抗ウイルス活性 (ブランク減少率%)	
	OMV ^{*1}	IHNV ^{*2}
100	100	100
50	100	100
25	100	94
12.5	60	58
6	25	37

*1：サケ科魚類ヘルペスウイルス (Oncorhynchus masou virus)

*2：伝染性造血器壊死症ウイルス (Infectious hematopoietic necrosis virus)

15

本抗ウイルス物質 46NW-04A を 15℃ で 1 時間ウイルス懸濁液と反応させ、サケ科細胞の c H S E-214 細胞に接種後、ウイルス吸着の後、細胞を Hanks' BSS で洗浄を行なった場合、DNA ウイルスである OMV に対しては 25 μg/ml の濃度で完全にブランク形成で阻止した。一方、RNA ウイルスの IHNV に対しては 50 μg/ml の濃度で完全にブランク形成を阻止した。12.5 μg/ml の濃度での両 OMV および IHNV へのブランクリダクションはそれぞれ 60% と 50% であり、IHNV に対しては 25 μg/ml の濃度で 94% のブランクリダクションが観察された。この抗ウイルス物質 46NW-04A の抗ウイルス作用機序はウイルスの細胞吸着阻害かウイルス粒子の崩壊であることから、ウイルス感染を阻止する新規抗ウイルス物質として魚類ウイルス病の防疫対策に役立つのみならず、広く動物ウイルス病の予防・治療への利用が期待される。

46NW-04A 物質はそのまま魚、動物または人に投与することもできるが、一般には生理学

16

的に許容される種々の担体と組み合わせて抗ウイルス製剤として通常使用されている剤形で投与される。そのような製剤の例としては、例えばカプセル剤、顆粒剤、散剤、錠剤、粉剤、トローチ剤、丸剤、シロップ剤、軟膏剤、坐剤、注射剤、注入剤等の他、特に魚や動物に対しては添加物としての形態が挙げられる。

また、そのような製剤には必要に応じて上記担体の他に補助剤、安定剤、賦形剤、着色剤、芳香剤等を含ませしめてもよい。さらに、46NW-04A 物質は単独で、または抗生物質等の他の薬剤との合剤として使用することができる。

(実施例)

次に、本発明を実施例により詳しく説明する。

実施例 1

シュードモナス sp. 46NW-04A 株 (FERM P-9579) を CYG 液体培地 (0.5% カザミノ酸 (Difco), 0.05% 酵母エキス (Difco), 0.1% グルコース, 0.68% NaCl, 0.04% KCl, 0.02% MgSO₄ · 7H₂O,

0.026% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を含む。pH 7.2) 100 ml / 500 ml 容フラスコに接種し、25℃で2日間160 r.p.m.で振とう培養した。培養液25 ml ずつを4本の5 l 容三角フラスコ中のCYG液体培地 2.5 l に接種し、25℃で3日間160 r.p.m.で振とう培養した。得られた培養上清液10 l を同量の酢酸エチルで2回抽出した。20 l の酢酸エチル層を2 l まで濃縮し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、褐色の粗抽出物 1.2 g を得た。

同じ操作を3回行ない計30 l の培養液から3.7 g の油状粗抽出物を得、これを少量のメタノール-クロロホルムに溶解させ、シリカゲル(キーゼルゲル60、230~400メッシュ、メルク社)を充填したカラム(50 mm × 150 mm)上加えた。クロロホルム、クロロホルム:メタノール(9:1)から同(7:1)、(5:1)、(3:1)、(1:1)に順次極性を上げながら溶出させた。

活性画分を濃縮後、少量のメタノール-クロロホルム混液に溶解させ、展開溶媒をクロロホルム、

クロロホルム:メタノール(9:1)から同(7:1)、(5:1)に順次極性を高めながらTLC(キーゼルゲル60 F 254、メルク社)を行なった。TLCを5回行ない最終的に709 mg の精製46NW-04Aを得た。なお、46NW-04Aの検出はアニスアルデヒド呈色反応と、サケ科魚類病原ウィルスの1つである伝染性造血器壊死症ウィルス(IHNV)に対する抗ウィルス活性をブラークリダクション法で確認することにより行なった。種々の展開溶剤によるTLCで単一スポットであることを確認し、精製を終了した。

(発明の効果)

本発明の新規物質46NW-04A物質はシェードモナス属に属する該物質生産菌を培養することによって得られる。また、この46NW-04A物質は抗ウィルス活性を有しており、特に魚類病原ウィルスに対する抗ウィルス活性を有している。

4. 図面の簡単な説明

第1図は46NW-04A物質をメタノールに

19

20

溶かして測定した紫外線吸収スペクトル(実線は中性、点線はアルカリ性、鎖線は酸性での結果を示す。)である。

第2図は46NW-04A物質を臭化カリウム錠ノ剤法で測定した赤外線吸収スペクトルである。

第3図は46NW-04A物質を重メタノールに溶かして測定した水素核磁気共鳴スペクトルである。

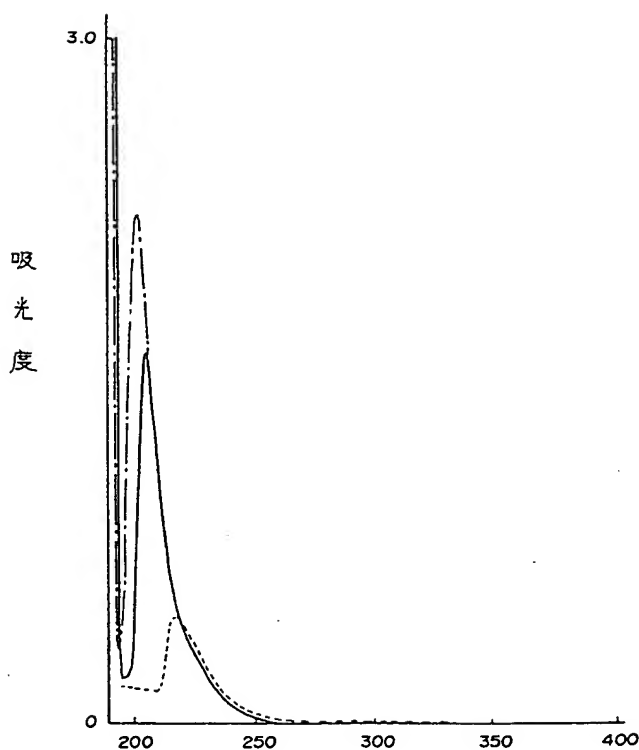
第4図は46NW-04A物質を重メタノールに溶かして測定した炭素核磁気共鳴スペクトルである。

特許出願人 サッポロビール株式会社

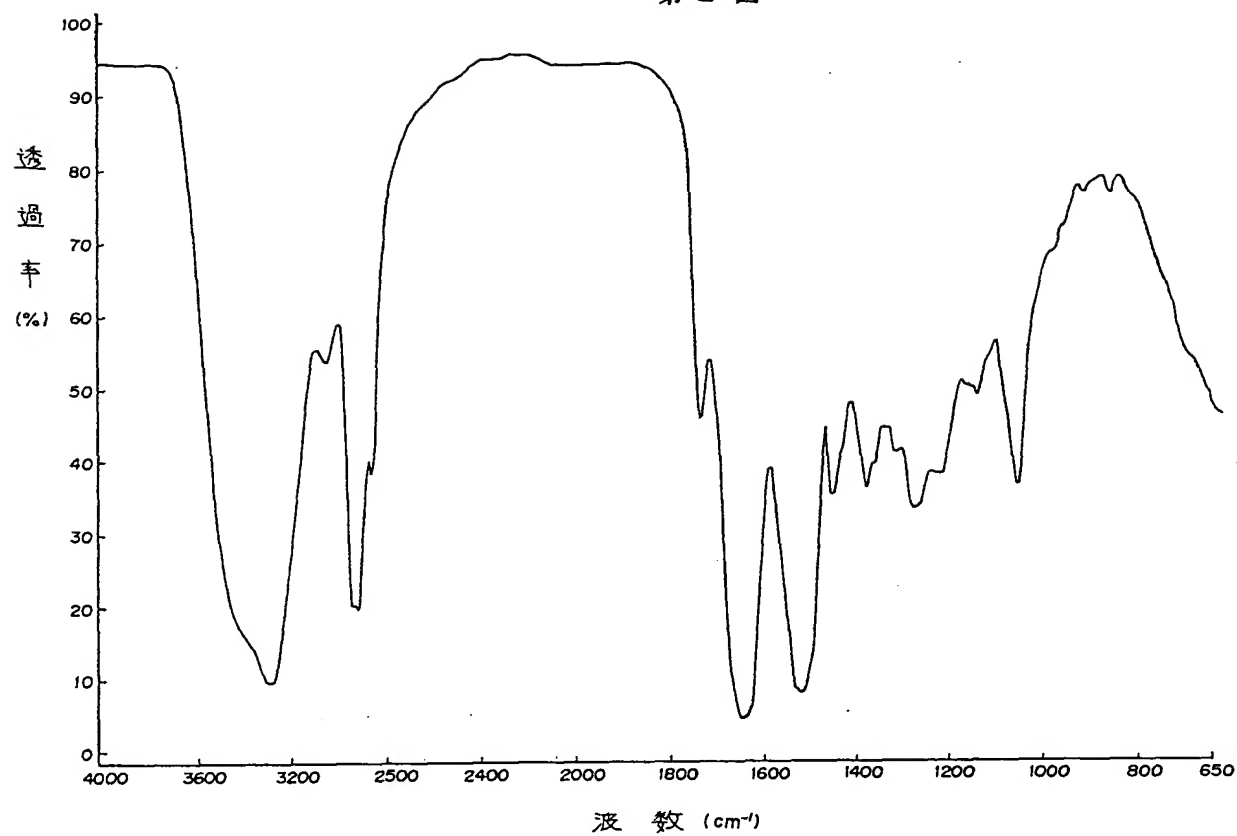
代理人 弁理士 久保田 藤 郎



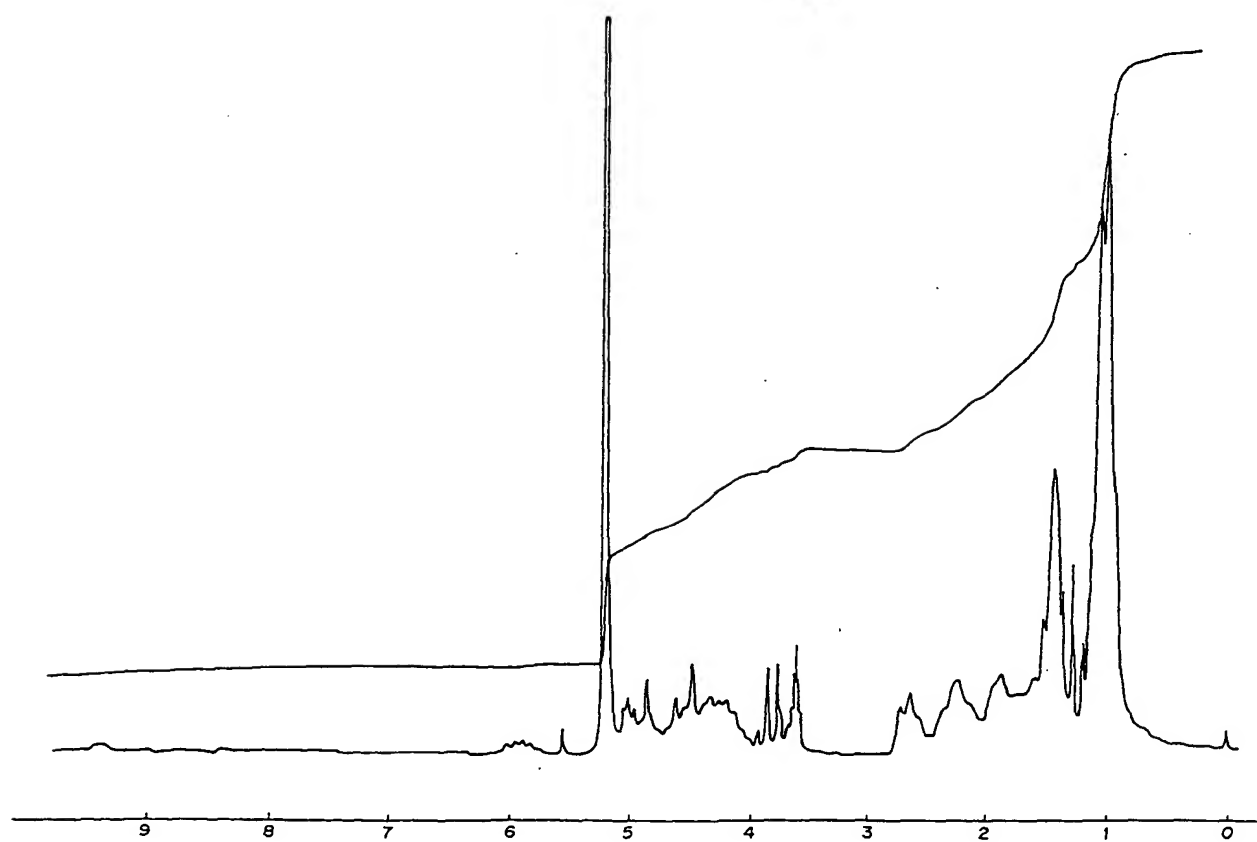
第1図



第 2 図



第 3 図



第 4 図

